

# La leishmaniosi viscerale nel bambino immunocompetente. Descrizione di due casi di recidiva dopo terapia specifica

***Mediterranean visceral leishmaniasis  
in immunocompetent children.***

***Report of two cases relapsed after specific therapy***

Claudia Colomba, Francesco Scarlata, Ludovico Salsa,  
Valentina Frasca Polara, Lucina Titone

Istituto di Patologia Infettiva e Virologia, Università degli Studi, Palermo, Italy

## INTRODUZIONE

La leishmaniosi viscerale (LV) del Mediterraneo, endemica nei paesi del bacino del Mediterraneo, colpisce soprattutto le zone costiere europee, nord-africane e medio-orientali [1].

In Italia le regioni più colpite sono la Campania e la Sicilia.

*Leishmania infantum* è la specie responsabile (zimodema MON 1 in più del 90% dei casi, MON 27, MON 187, e MON 189 nei rimanenti), il cane è il principale serbatoio e un dittero ematofago appartenente al genere *Phlebotomus* ne è il vettore.

La LV nel bambino rappresenta, ancor più che nell'età adulta, a causa della relativa e fisiologica immaturità del sistema immune cellulomediato, principale effettore della risposta immune all'infezione, una patologia grave che se non adeguatamente trattata porta progressivamente a morte.

Negli ultimi 5 anni i casi pediatrici di LV ricoverati presso la divisione clinicizzata di Malattie Infettive dell'ospedale pediatrico "G. Di Cristina" di Palermo sono stati 29. Dopo un ciclo di terapia specifica [7 sono stati trattati con n-dimetilglucamina stibiato (Glucantim), 22 con Amfotericina B liposomiale (AmBisome)] tutti hanno effettuato un follow-up di 360 giorni con controlli clinici e di laboratorio a 30, 90 e 180 giorni. La guarigione clinica e parassitologica è stata confermata in tutti i casi eccetto 2, che sono andati incontro a recidiva.

## 1° CASO CLINICO

Bambino maschio di 9 mesi residente in provincia di Agrigento (Sicilia) malato da 15 giorni si ricovera per la comparsa di febbre alta, iporesia e scarso accrescimento. Al momento del ricovero il pallore e la splenomegalia (milza palpabile all'ombelicale trasversa di consistenza duro-ligneale) sono i soli segni clinici degni di nota. Gli esami ematochimici eseguiti sono indicati in Tabella 1.

Il quadro clinico (febbre, pallore e splenomegalia), epidemiologico (residenza in area endemica) e di laboratorio (pancitopenia e incremento degli indici di flogosi) pertanto orientano già in 2ª giornata di degenza verso il sospetto diagnostico di leishmaniosi viscerale. L'immunofluorescenza indiretta (IFI) per *Leishmania* risulta positiva con un titolo di 1:320. La diagnosi di certezza viene fatta con l'identificazione del parassita a livello midollare: l'osservazione microscopica dell'aspirato midollare evidenzia numerose leishmanie a sede intra- ed extra-cellulare.

La PCR-leishmania risulta positiva su midollo (1000 copie/5 milioni di cellule) e su sangue periferico (1000 copie/5 milioni di cellule). Viene praticata terapia con Glucantim (90 mg/Kg/die) per 28 gg con progressivo miglioramento del quadro clinico (sfebbrato in 4ª giornata) e di laboratorio.

Il bambino viene dimesso in 30ª giornata di degenza dopo aver eseguito un secondo aspirato midollare che, risultato negativo per la ricerca

**Tabella 1 - Monitoraggio di laboratorio del paziente n. 1 nel periodo di follow-up programmato.**

	D-0	D-30	Ricaduta	D-30	D-90	D-180	D-360
FEBBRE	si	no	si	no	no	no	no
G.R. $\times 10^6$ $\mu$ L	3.9	4.7	5	5.5	5.3	5.1	4.7
Hb (g/dl)	8.7	10.2	9.9	11.9	12.2	13	12.2
G.B. $\times 10^6$ $\mu$ L	8.2	8.9	7.7	11.4	8.2	8.7	8.4
PLTx $10^3$ $\mu$ L	198	252	139	388	252	286	263
VES mm/h	108	28	83	11	20	8	ND*
PCR mg/dl	2.2	1.3	4.5	0.6	0.2	ND*	0.5
Proteine g/dl	7	7.2	7.5	7.6	6.9	7	6.7
IFI-leishmania	1:320	1:160	1:1280	1:80	1:80	1:80	1:80
Esame microscopico midollo	positivo	negativo	positivo	negativo			
PCR-leishmania su midollo	1000	1000	100000	0			
PCR-leishmania su sangue periferico	1000	ND	1000	0			Casi clinici

\*ND = non determinato

di leishmanie all'osservazione microscopica, ne documenta la presunta guarigione parassitologica. Su un campione di midollo prelevato in 30<sup>a</sup> giornata e congelato a -20°C successivamente si esegue la PCR-leishmania che evidenzia la presenza del parassita (1000 copie/5 milioni di cellule).

Al primo controllo post-ricovero effettuato in regime di day-hospital (D-90) il bambino si presenta pallido e febbrile. Alla visita si apprezza epato-splenomegalia con milza di consistenza duro-ligneo. Gli esami ematochimici sono indicati in Tabella 1.

La PCR-leishmania eseguita su sangue periferico risulta positiva (1000 copie/5 milioni di cellule). Il bambino si ricovera dunque per verosimile ricaduta della malattia; eseguito l'aspirato midollare, all'esame microscopico diretto si apprezza la presenza di parecchie leishmanie e la PCR risulta positiva su midollo (100.000 copie/5 milioni di cellule) e sangue periferico (1000 copie/5 milioni di cellule). Inizia terapia con amfotericina B liposomiale (AmBisome 3mg/Kg/die) per 10 gg consecutivi. Sfebbra in 2<sup>a</sup> giornata di terapia e viene dimesso alla fine del trattamento.

Al follow-up eseguito dopo 30 giorni il bambino si presenta in ottime condizioni cliniche, gli esami di laboratorio sono normali (Tabella 1), le leishmanie sono assenti dal midollo e la PCR è negativa. Il periodo di follow-up clinico e di laboratorio si conclude a 360 giorni dalla ricaduta e conferma la guarigione del piccolo paziente.

## ■ 2° CASO CLINICO

Bambina di 14 mesi residente in provincia di Agrigento (Sicilia) malata da 15 giorni si ricovera per febbre persistente. All'esame obiettivo la bambina presenta pallore e splenomegalia. Gli esami ematochimici evidenziano pancitopenia e incremento degli indici di flogosi (Tabella 2). L'IFI-leishmania è positiva con un titolo di 1:320. L'esame microscopico dell'aspirato midollare evidenzia numerose leishmanie in sede intra- ed extra-cellulare: viene posta diagnosi di leishmaniosi viscerale. La PCR-leishmania risulta positiva su midollo (1000 copie/5 milioni di cellule) e sangue periferico (1000 copie/5 milioni di cellule). Inizia la terapia specifica con AmBisome al dosaggio di 3mg/Kg/die che effettua per 6 giorni (5 dosi più 1 in 10<sup>a</sup> giornata) ottenendo lo sfebbramento in 2<sup>a</sup> giornata con progressivo miglioramento dei parametri ematologici. Al controllo effettuato dopo 30 giorni la bambina appare guarita sia dal punto di vista clinico che parassitologico (l'esame microscopico del midollo è negativo e la PCR-leishmania è negativa sia su midollo che su sangue).

Al successivo controllo programmato dopo 90 giorni, il quadro clinico ed ematologico risulta nella norma (Tabella 2).

Dopo circa un mese dall'ultimo controllo (D-130) la piccola torna alla nostra osservazione per comparsa di febbre. L'IFI-leishmania è positiva con titolo 1:320 e la PCR su sangue periferico rileva la presenza di 1000 copie. La bambina viene ricoverata ed effettua un aspirato

**Tabella 2 - Monitoraggio di laboratorio del paziente n. 2 nel periodo di follow-up programmato.**

	<i>D-0</i>	<i>D-30</i>	<i>Ricaduta</i>	<i>D-30</i>	<i>D-90</i>	<i>D-180</i>	<i>D-360</i>
FEBBRE	si	no	si	no	no	no	no
G.R. x10 <sup>6</sup> µL	3.5	4.9	3.38	4.83	5.26	5.15	
Hb (g/dl)	7.5	11.3	7.1	11.8	13.2	15.3	
G.B. x10 <sup>6</sup> µL	3	9.9	3.28	11.1	10.6	6.5	
PLT x 10 <sup>3</sup> µL	85	413	60	392	316	227	
VES mm/h	ND*	15	ND	35	11	15	
PCR mg/dl	12.6	0.2	10.5	5.4	0.2	0.2	
Proteine g/dl	5.9	7.6	ND	7.7	7.5	7.6	
IFI-leishmania	1:320	1:160	1:320	1:160	1:160	1:80	
Esame microscopico midollo	positivo	negativo	positivo	negativo			
PCR-leishmania su midollo	1000	0	10000	0			
PCR-leishmania su sangue periferico	1000	0	1000	0	0	0	0

\*ND = non determinato

midollare che risulta positivo all'esame microscopico e alla PCR (10.000 copie/5 milioni di cellule). Per tale motivo viene sottoposta ad un secondo ciclo di terapia con AmBisome (3 mg/Kg/die) per 10 giorni consecutivi. Dopo 30 giorni l'esame microscopico del midollo e la PCR-leishmania su midollo e su sangue periferico risultano negativi. Al controllo effettuato a 90 e 180 giorni dalla ricaduta, la bambina è asintomatica e i suoi esami ematochimici non mostrano alterazioni (Tabella 2). La PCR-leishmania su sangue persiste negativa.

## ■ DISCUSSIONE

Sin dal 1940 i composti di antimonio pentavalente, l'antimoniato di n-dimetilglucamina (Glucantim), lo stibogluconato di sodio (Pentostam), hanno costituito le strade maestre nella terapia anti-leishmania in tutto il mondo [2]; allorché impiegati nel bambino si sono dimostrati sicuri ed efficaci [3-4]. La resistenza agli antimoniali, ampiamente documentata in India e Sudan [5], non sembra essere ad oggi un problema presente nella nostra area geografica anche se nella casistica pediatrica da noi riportata abbiamo osservato 2 ricadute dopo terapia con Glucantim [4]. L'amfotericina B liposomiale (AmBisome) è il solo farmaco approvato dalla U.S. Food and Drug Administration per il trattamento della LV in pazienti immunocompetenti secondo uno schema posologico di 7 somministrazioni nei giorni 1-5, 14 e 21 alla dose di

3 mg/Kg/die [6]. Numerosi studi hanno dimostrato la possibilità di impiegarlo con successo nel bambino immunocompetente alla dose di 3 mg/Kg/die per 6 giorni (una dose al giorno per i primi 5 giorni e un'ultima dose in 10<sup>a</sup> giornata) [7]. Grazie alla più breve durata del trattamento e alla conseguente riduzione del periodo di degenza in ospedale, l'AmBisome, nonostante il costo elevato, risulta essere più conveniente non solo in termini economici, ma anche perché riduce il rischio di infezioni da agenti virali e batterici in ambito ospedaliero.

Diversi studi hanno già dimostrato l'elevata sensibilità e specificità della PCR effettuata su campioni di sangue periferico nella diagnosi e nel monitoraggio della LV nei soggetti con infezione da HIV [8-10]. Nei soggetti immunocompetenti benché la sierologia specifica per Leishmania abbia una notevole utilità, la conferma microbiologica della diagnosi ha richiesto sino ad oggi l'utilizzo di metodiche invasive quali l'aspirato o la biopsia osteomidollare. Dai risultati di studi condotti su bambini immunocompetenti affetti da LV è stata confermata l'utilità della PCR effettuata su sangue periferico [11, 12].

Nel follow-up dei due pazienti la PCR si è dimostrata ancora una volta uno strumento utile per il monitoraggio semplice, non invasivo e predittivo di recidiva di malattia; l'esame eseguito su sangue periferico rappresenta dunque una metodica di diagnosi parassitologica rapida ed attendibile.

Nel secondo caso clinico, poiché non è stato isolato e tipizzato il ceppo di Leishmania e dal mo-

mento che la PCR-leishmania eseguita su midollo a 30 giorni dal ricovero risultava negativa, non è possibile escludere una reinfezione, evenienza possibile ma improbabile data l'età della paziente.

Concludendo, per i pazienti pediatrici affetti da LV è importante effettuare un follow-up pro-

lungato poiché nonostante l'apparente guarigione clinica e parassitologica, in rari casi si può verificare una ricaduta dopo alcuni mesi dal primo episodio.

**Key words:** visceral leishmaniasis, children, immunocompetent, relapses

## RIASSUNTO

La leishmaniosi viscerale (LV), endemica nelle zone costiere dei Paesi del bacino del Mediterraneo (Spagna, Italia, Francia, Grecia, Tunisia, Marocco), è causata da *Leishmania infantum* e trasmessa all'uomo da un dittero ematofago appartenente al genere *Phlebotomus* spp.; il cane è il principale serbatoio dell'infezione. Sono descritti 2 casi di LV in bambini immunocompetenti non rispondenti alla terapia. Entrambi i pazienti residenti in aree endemiche per leishmaniosi (Sicilia) presentavano febbre, pallore e splenomegalia al momento del ricovero. La diagnosi definitiva è stata fatta con l'identificazione del parassita a livello midollare mediante esame microscopico e

polimerase chain reaction (PCR). La PCR eseguita su sangue periferico di bambini immunocompetenti affetti da LV si è dimostrata una tecnica altamente sensibile e utile nel monitoraggio della guarigione parassitologica. Un paziente era stato trattato con N-dimetilglucamina (Glucantim), l'altro con Amfotericina B liposomiale (AmBisome) con apparente guarigione clinica alla fine della terapia. Entrambi hanno però mostrato una ripresa della sintomatologia dopo 3 mesi e trattati con AmBisome i.v. alla dose di 3mg/Kg per 10 giorni consecutivi sono guariti. Un follow-up di 1 anno è stato programmato per entrambi.

## SUMMARY

Visceral leishmaniasis (VL) is endemic in areas bordering the Mediterranean Sea (Spain, Italy, France, Greece, Morocco, Tunisia) where it is caused by *Leishmania infantum* and is transmitted by the bite of a hematophagous sandfly belonging to *Phlebotomus* spp.; the dog constitutes the main reservoir of infection. Two cases of VL in immunocompetent children are described. Both patients lived in endemic areas for leishmaniasis (Sicily) and at admission were febrile, pale and had splenomegaly. In both patients anti-leishmania antibodies were present and a definitive diagnosis was confirmed by demonstration of leishma-

nia parasites by microscopy or polymerase chain reaction (PCR) in the bone marrow aspirates. The use of PCR performed on peripheral blood has been reported to be highly sensitive for the diagnosis and follow-up of children with VL. One patient was treated with N-dimethylglucamine, Glucantim, the other one with liposomal Amphotericin B (AmBisome). Both had symptomatic relapses 3 months later, and recovered following retreatment with AmBisome administered intravenously at a dosage of 3 mg/Kg for ten consecutive days. The patients were monitored for one year after treatment was completed.

## BIBLIOGRAFIA

- [1] World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Geneva, Switzerland: WHO, 1990. Technical Report Series No. 9793.
- [2] Murray H.W. Treatment of visceral leishmaniasis (Kala-azar): a decade of progress and future approaches. *Int. J. Infect. Dis.* 4, 158-177, 2000.
- [3] Cascio A., Gradoni L., Scarlata F. et al. Epidemiology surveillance of visceral leishmaniasis in Sicily, Italy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 57, 75-78, 1997.

- [4] Cascio A., Colomba C., Antinori S. Pediatric visceral leishmaniasis in western Sicily, Italy: a retrospective analysis of 111 cases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 277-282, 2002.
- [5] Lira R., Sundar S., Makharia A. et al. Evidence that the high incidence of treatment failure in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J. Infect. Dis.* 180, 564-567, 1999.
- [6] Meyeroff A. U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome (liposomal amphotericin B) for

treatment of visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 28, 42-48, 1999.

[7] di Martino L., Davidson R.N., Giacchino R. et al. Treatment of visceral leishmaniasis in children with liposomal amphotericin-B. *J. Pediatrics* 131, 271-277, 1997.

[8] Piarroux R., Gambarelli F., Dumon H., et al. Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture, and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.* 32, 746-749, 1994.

[9] Lachaud L., Dereure J., Chabbert E. et al. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and fol-

low-up of visceral leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J. Clin. Microbiol.* 38, 236-240, 2000.

[10] Pizzuto M., Piazza M., Senese D., et al. Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type 1. *J. Clin. Microbiol.* 39, 357-361, 2001.

[11] Minodier P., Piarroux R., Garnier J.M., et al. Pediatric visceral leishmaniasis in southern France. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 17, 701-704, 1998.

[12] Cascio A., Calattini S., Colomba C., et al. Polymerase Chain Reaction in the diagnosis and prognosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in immunocompetent children. *Pediatrics* 109, (2) E-27, 2002.